

DNA 损伤修复与亨廷顿病的发生机制 *

朱 姝^{1)**} 唐铁山²⁾

⁽¹⁾ 南开大学经济与社会发展研究院与中国科学技术发展战略研究院联合博士后工作站, 北京 100038;

⁽²⁾ 中国科学院动物研究所膜生物学国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 亨廷顿病(Huntington's disease, HD)是一种常染色体显性遗传的神经退行性疾病, 是由于亨廷顿基因(*Htt*)发生突变而导致的, 突变的亨廷顿蛋白(mutant huntingtin, mHtt)会在胞内产生聚集引起细胞功能异常并引发神经退行。亨廷顿病的具体分子机制有多种假说, 例如氧化压力、线粒体功能异常等。2017 年《自然》(*Nature*)杂志发文认为 DNA 损伤修复异常是神经退行性疾病发生的共同机制。大量证据显示, DNA 损伤修复在 HD 的发生中扮演着重要角色, Htt 突变会引发多种 DNA 损伤以及修复通路的过度激活, HD 细胞对离子辐射敏感同时存在双链断裂修复缺陷, 同时 Htt 突变会阻碍 DNA 修复关键因子共济失调毛细血管扩张突变(ATM)蛋白在 DNA 修复中正常功能的发挥。DNA 修复通路还是 HD 发病年龄的重要影响因素。此外, 将 ATM 做为治疗靶点能够减轻突变 Htt 引发的细胞毒性以及动物模型的疾病进程。ATM 还在维持细胞稳态和线粒体信号中起着关键作用, 鉴于线粒体异常与 HD 发病的相关性, ATM 作为治疗靶点的分子机制也逐渐明朗。本文着重于介绍 DNA 损伤修复与亨廷顿病的发生机理的研究进展, 为阐明 HD 的发病机理, 开发有效的治疗手段提供思路。

关键词 亨廷顿病, 亨廷顿蛋白, DNA 损伤修复, ATM, 发病年龄

学科分类号 Q189, Q291

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0208

亨廷顿病(Huntington's disease, HD)是一种常染色体显性遗传的神经退行性疾病, 在 1872 年首次由 George Huntington 医生发现, 直到 1993 年研究人员才证实它是由于亨廷顿蛋白(huntingtin, Htt)的突变引起的, Htt 突变会导致蛋白质构象发生改变, 从而在胞内发生异常聚集, 导致神经元死亡以及进行性的神经退行^[1]。HD 的致病机理目前并不完全清楚, 现有证据支持一些假说, 例如氧化压力、线粒体功能异常和基因毒性压力都是引发 HD 的潜在分子机制。越来越多的研究聚焦 DNA 损伤修复异常在神经退行性疾病中所起的作用, 2017 年《自然》(*Nature*)杂志发文认为 DNA 修复异常可能是神经退行性疾病的共同机制^[2]。DNA 是人体最重要的遗传物质, 遗传信息必须完整保存并高保真地传递下去。DNA 会发生多种不同种类的损伤, 为了维持基因组的稳定性, 真核细胞进化出了 DNA 损伤应答机制(DNA damage response, DDR)来应对这些威胁^[3]。一旦 DNA 损伤未能被正确修复, 就会导致细胞发生细胞周期阻滞、转录抑制、代谢异常, 甚至是细胞衰老和细胞凋亡, 进而导致多种疾病例如肿瘤、脑衰老以及神经退行性疾病的发

生^[4]。很多研究结果都支持 DNA 损伤修复在 HD 的发病中起重要作用, 本文综述了 DNA 损伤修复与 HD 发病机理的相关证据和研究进展, 对将 DNA 修复通路作为 HD 治疗靶点的可能性进行探讨, 为开发有效的治疗手段及药物提供思路。

1 亨廷顿病和亨廷顿蛋白

亨廷顿病是一种与衰老和年龄相关的多聚谷氨酰胺延长(polyglutamine expansion, polyQ)的神经系统退行性病变^[1]。HD 病人体内 *Htt* 基因存在 CAG 三核苷酸重复次数的异常增加, 在蛋白质水平上表现为多聚谷氨酰胺延长, 病理表现为基底神经节纹状体神经元的死亡以及大脑萎缩。HD 的临床症状表现为舞蹈样运动、认知障碍和精神失常^[5]。

HD 的发生与 Htt 中多聚谷氨酰胺(polyQ)的数量密切相关, 正常个体中 Htt 通常包含 11~34 个谷氨酰胺残基, 当 Htt 中 polyQ 的数量大于 35 个

* 国家自然科学基金资助项目(30970931)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-58884621, E-mail: zhus@casted.org.cn

收稿日期: 2017-06-05, 接受日期: 2017-08-17

就会引发 HD, polyQ 的数量越多, 疾病的发生时间就越早, 严重程度也越高^[6]. Htt 含有 3 144 个氨基酸, 在人类和啮齿动物各组织中广泛表达, 在中枢神经元和睾丸中表达量最高. Htt 具有重要的生物学功能, 在发育的不同阶段起着关键作用, 能够抗凋亡、促进囊泡运输、参与网格蛋白调控的细胞内吞, 还能调节树突形态, 同时还参与转录调控^[7-8].

2 DNA 修复异常是神经退行性疾病发生的重要原因

神经退行性疾病是一类致命的神经系统病变,

随着人口老龄化的日益严重, 神经退行性疾病的发病率逐渐上升. 据统计, 中国现在有超过 900 万阿尔茨海默病患者、200 万帕金森病患者, 迫切需要弄清这类疾病的发病机理, 开发有效的诊断和治疗手段及药物. 研究证实, DNA 损伤在神经元中的积累与神经退行性疾病的发生有关, 包括亨廷顿病、阿尔茨海默病(AD)和帕金森病(PD). 已知的很多神经退行性疾病都是由于 DNA 损伤缺陷引起的, 几乎所有 DNA 损伤修复相关疾病都伴随着进行性运动障碍或者神经系统病变, 通常是由于小脑或基底神经节中神经元功能异常而导致的(表 1).

Table 1 Human genetic neurological disorders associated with DDR defects^[2-4]

表 1 DNA 损伤应答缺陷相关的人类遗传神经系统疾病^[2-4]

	疾病名称(按修复类型分)	突变基因	神经系统相关表型
核苷酸切除修复(NER), 链间交联修复(ICLR)	脑眼面骨骼综合征(COFS)	<i>CSB, XPD, XPG, ERCC1</i>	脑部钙化, 髓鞘形成减少, 头小畸形, 神经退行
	科克因综合征(CS)	<i>CSA, CSB, XPB, XPD, XPG</i>	头小畸形, 神经退行, 神经元髓鞘脱失
	毛发硫营养不良(TTD)	<i>XPB, XPD, TTDA</i>	髓鞘形成减少, 神经退行
	着色性干皮症(XP)	<i>XPA-G, POLH</i>	头小畸形, 神经退行
	XPF-ERCC1(XFE)综合征	<i>XPF</i>	头小畸形
	范科尼贫血症(FA)	<i>FANCA-C, FANCD1, D2, FANCE-G, FANCL, J, L-N</i>	头小畸形
	角化不良症(DKC)	<i>DKC1, TERC</i>	头小畸形, 智力迟钝
单链断裂修复(SSBR)	动眼不能共济失调 1 型(AOA1)	<i>APTX</i>	共济失调, 神经退行, 动眼不能
	动眼不能共济失调 2 型(AOA2)	<i>SETX</i>	共济失调, 神经退行, 动眼不能
	脊髓小脑共济失调共轴突神经病变(SCAN1)	<i>TDPI</i>	共济失调, 神经退行, 肌无力
	XRCC1 共济失调性运动失调 (AOA-XRCC1)	<i>XRCC1</i>	共济失调, 眼部与四肢运动不能
双链断裂修复(DSBR)	布鲁姆综合征(BS)	<i>BLM</i>	头小畸形, 轻微智力迟钝
	免疫缺陷共头小畸形	<i>XLFI</i>	头小畸形
	Ligase IV 综合征	<i>LIG4</i>	头小畸形
	头小畸形, 顽固癫痫和发育迟缓综合征(MCSZ)	<i>PNKP</i>	头小畸形
	Aicardi Goutieres 综合征(AGS)	<i>RNASEH2, TREX1</i>	大脑萎缩, 颅内钙化, 头小畸形, 神经退行
	共济失调毛细血管扩张(A-T)	<i>atm</i>	共济失调, 小脑退行, 动眼不能
	类 A-T 综合征(A-TLD)	<i>MRE11</i>	共济失调, 小脑退行, 动眼不能
	奈梅亨断裂综合征(NBS)	<i>NBS1</i>	头小畸形
	类 NBS 综合征(MBSLD)	<i>RAD50</i>	头小畸形
	塞克尔综合征(SS)	<i>ATR, PCTIN, SCKL2, SCKL3</i>	头小畸形, 智力迟钝
	原发性头小畸形 1 型	<i>MCPH1</i>	头小畸形, 智力迟钝
氧化压力(oxidation stress)	肌萎缩侧索硬化症(ALS)	<i>SOD1, SETX</i>	运动神经元退化
	Charcot-Marie-Tooth 综合征 (CMT)	<i>PMP22, GJB1, MTMR2, SH3TC2, EGR2, MTMR13</i>	运动感知神经病变, 神经元髓鞘脱失
	脊髓小脑共济失调癫痫综合征 (SCAE)	<i>POLG, TWINKLE</i>	共济失调, 发音困难, 神经病变

由于神经系统具有组织特异性, 其对于 DNA 损伤极为敏感. 首先, 在神经系统发育的早期阶段, DNA 修复非常重要, 未修复的 DNA 损伤和相关修复基因的突变会对功能性神经系统的形成产生巨大的影响, 很多 DNA 修复相关基因的敲除都会导致小鼠胚胎发育异常和神经元凋亡^[9]; 其次, 脑部是人体所有组织器官中氧气消耗最多的部位, 神经元中存在着高水平的线粒体呼吸, 因此神经细胞经受高度的氧化压力, 活性氧的增加会引起 DNA 氧化损伤的积累^[10]; 第三, 神经细胞是终末分化的有丝分裂后细胞, 正常情况下体细胞能够通过复制来修复部分 DNA 损伤, 而神经元则无法通过这种途径来修复损伤, 同时处于 G0 期的细胞只能通过易错的非同源末端连接(NHEJ)通路, 而不能通过高保真的同源重组(HR)通路来修复 DNA 双链断裂(DSBs)^[11], 错误修复的积累也会导致神经元的功能异常; 第四, DNA 损伤会干扰转录, 与其他组织细胞相比, 神经细胞主要依赖转录来调节自身功能, 神经细胞中 DNA 损伤的积累可能导致神经元中某些关键的转录无法发生, 从而引发细胞功能失调甚至凋亡, 进而引起神经退行^[12-14].

3 DNA 损伤修复与亨廷顿病的发病机理

3.1 HD 突变导致多种类型的 DNA 损伤以及修复通路的激活

在多种含有 mHtt 的细胞类型和 HD 疾病模型中, 都能检测到不同类型的 DNA 损伤的增多以及修复通路的激活. 在 HD 模型小鼠 R6/2 的纹状体、HD 病人的纹状体神经元以及大脑皮层分离的线粒体中都存在氧化 DNA 损伤^[15-17]. 氧化压力一直被认为是诱导 HD 发病的主要机制之一, HD 病人通常伴随着线粒体动态的损伤, 同时线粒体转运异常和功能失调也是 HD 的发生原因, 线粒体功能失调会导致活性氧的增多造成氧化损伤的增加^[18]. 氧化 DNA 损伤的积累会激活单碱基切除修复酶 OGG1, OGG1 的激活代表碱基切除修复(BER)的发生^[19]. Htt 突变也会导致错配修复(MMR)通路的激活^[20]. 表达 mHtt 的细胞中能够观察到单链断裂(SSBs)和双链断裂(DSBs), 同时伴随着共济失调毛细血管扩张突变(ATM)蛋白、H2AX 和 p53 的激活, 并且在 mHtt 形成聚集之前就能检测到链断裂的存在, 从出生 25 天和 50 天的 HD 小鼠脑部切片中也能观察到链断裂修复通路的激活, 说明在 HD 发病早期 DNA 损伤应答通路就会被激活^[21]. 综上所述, 在

HD 病人以及模型细胞中存在多种类型的 DNA 损伤以及修复信号的激活, HD 细胞可能存在 DNA 损伤修复缺陷, 这些诱导细胞凋亡的 DNA 损伤事件可能促进了神经退行.

3.2 HD 细胞对离子辐射敏感并存在双链断裂修复缺陷

在 1980 年代, 不同的研究组就已经通过克隆存活实验发现 HD 病人细胞对于离子辐射敏感^[22-25]. 很多疾病比如着色性干皮症(XP)、范可尼贫血症(FA)、科克因综合征(CS)来源的细胞都会表现出辐射敏感性, 这些疾病都是由于 DNA 损伤修复基因的突变而导致的, 辐射敏感性与 DNA 修复障碍有很强的关联, 上述结论也说明 Htt 可能参与离子辐射诱导的 DNA 损伤修复以及信号传导^[26-27].

2014 年 Ferlazzo 等^[27]进一步研究了导致 HD 细胞辐射敏感性的具体机制, 他们验证了 HD 皮肤成纤维细胞在离子辐射处理之后存活率降低, 这种辐射敏感性与 ATM 依赖的双链断裂修复(DSBR)缺陷有关. 尽管离子辐射能够诱导多种不同类型的 DNA 损伤, 但是只有 DSB 修复缺陷会导致人类细胞对辐射敏感. 在所有的 DNA 损伤类型中, 双链断裂(DSBs)是最为严重的一种, 细胞中存在一个未修复的 DSB 就会导致细胞死亡^[28], 如果被错误地修复, 会引发潜在的肿瘤倾向^[29]. 实验表明, mHtt 的表达会导致 DSB 修复信号的过度激活, 过表达 43Q-Htt 的细胞在血清饥饿或者还原剂处理后 ATM/ATR 损伤应答通路会被激活, 在 PC12 细胞中过表达 polyQ 蛋白也能够诱导 H2AX 的磷酸化, 同时在 HD 病人的成纤维细胞中也能观察到类似现象^[30], 在小鼠胚胎成纤维细胞、HD 小鼠模型和 HD 病人脑部神经元中表达全长人源 mHtt 都能使 ATM 的激活显著增强^[31]. 实验证明, 神经元中 mHtt 的表达使得 H2AX 的磷酸化水平显著升高, mHtt 通过与非同源末端连接(NHEJ)中的关键调控蛋白 Ku70 相互作用, 阻碍正常的修复从而使 DSBs 不断积累引发神经退行^[32], 同时 HD 果蝇以及小鼠模型的神经元都显示出 DSB 修复活性的降低^[33], HD 病人休眠期的成纤维细胞受到损伤后 24 h 还存在着显著的未修复 DSBs 和 SSBs. 上述研究结果证明 Htt 突变会引发双链断裂(DSBs)增多以及 DSB 信号传导缺陷, 导致双链断裂损伤的积累和细胞凋亡.

3.3 Htt 突变影响 ATM 的正常功能

HD 细胞中 DNA 修复缺陷的分子机制也日渐

明朗. 2014 年 Ferlazzo 等^[27]利用免疫荧光分析证明, HD 病人休眠期的成纤维细胞在受到辐射后 H2AX 的磷酸化升高, ATM 和 MRE11 形成明显的异常聚集, 同时还存在 ATM 核穿梭的延迟, 研究人员推测 mHtt 与 ATM 相互作用阻碍了 ATM 在 DNA 损伤后的核穿梭, 使得 ATM 在 DNA 损伤后不能迅速到达损伤位点发挥作用, 从而导致了 HD 细胞的辐射敏感和 DNA 修复缺陷. 2016 年 Truant 等给出了 Htt 参与 DNA 损伤应答的直接证据, 利用新型的荧光纳米探针来标记活细胞内源的人源 Htt, 结果显示内源的 Htt 直接参与 DNA 氧化损伤修复, 在损伤发生之后, Htt 能够直接到达损伤位点并且这种共定位依赖于 ATM 的激酶活性. 超分辨率显微镜和生化试验显示在氧化压力下 Htt 会到达损伤位点作为支架蛋白发挥作用, polyQ 导致

Htt 的蛋白构象发生变化, 不能作为支架蛋白, mHtt 滞留在 DNA 损伤位点阻碍修复的正常进行, 导致 ATM 激活的延长, 作者认为 Htt 突变造成了其在 DNA 损伤修复中的功能异常, DNA 氧化损伤的不断积累引发神经细胞的死亡和神经退行^[34]. 综上所述, mHtt 从两个方面阻碍 ATM 在 DNA 损伤修复信号传导中的正常功能, 导致 ATM 信号通路的过度激活和 DNA 损伤修复缺陷, 一方面 mHtt 与胞质中的 ATM 相互作用阻止其在 DNA 损伤后迅速入核, 另一方面在细胞核内 mHtt 失去了作为支架蛋白的功能, 在 DNA 损伤后滞留在损伤位点阻碍 ATM 到达损伤位点发挥作用, 从而使得 ATM 处于持续激活的状态, 同时导致损伤修复缺陷引发 DNA 损伤的不断积累(图 1).

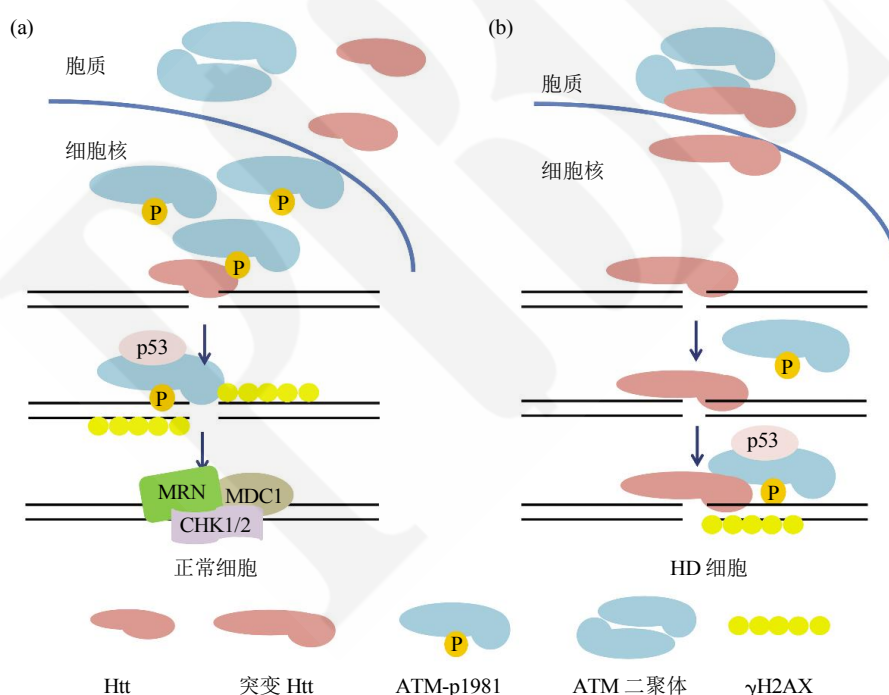


Fig. 1 mHtt induces the abnormal recognition of DSBs and excessive activation of ATM signals

图 1 Htt 突变导致 DSB 识别缺陷以及 ATM 信号的过度激活

(a)正常细胞中的 DNA 损伤应答反应. 正常细胞在受到 DNA 损伤后, ATM 二聚体会发生自磷酸化并解聚形成单体, 进入细胞核到达损伤位点, Htt 作为支架蛋白发挥作用, ATM 随后招募下游一系列的效应分子完成信号传导及修复. (b) HD 细胞中 mHtt 阻碍正常修复的进行. 在 HD 细胞中, 一方面 mHtt 与 ATM 在胞质中相互作用阻碍 DNA 损伤后 ATM 的核穿梭, 另一方面在细胞核内 mHtt 停滞在损伤位点阻碍 ATM 发挥正常功能, 使得 ATM 以及下游信号持续激活, DNA 损伤修复受阻.

3.4 DNA 修复相关基因影响 HD 的发病年龄

HD 的发病年龄受到多方面的调控, 最主要的影响因素是 CAG 不稳定性和遗传修饰因子. Htt 基因中 CAG 的长度越长, HD 的发病时间就越早,

疾病的严重程度也越高, CAG 重复地延伸在脑部区域高度不稳定从而引发神经退行^[35], 但是疾病的出现时间和症状还受到很多其他因素的调控, 例如遗传修饰因子. 鉴定影响 CAG 不稳定性和改变疾

病病程的遗传修饰因子为理解疾病的早期发展路径提供了新的方向。

研究发现很多参与 BER、NER 和 MMR 的蛋白对于 CAG 的稳定性都至关重要。在 *Hdh^{Q111}* 小鼠中错配识别复合物 MutS β (MSH2-MSH3) 对于体细胞 Htt CAG 扩增是必需的, 在其他 HD 小鼠模型中的研究结果也支持 MMR 通路在体细胞不稳定性中所起的重要作用^[36-38]。2013 年 Pinto 等^[39]的研究小组首次在 HD 模型小鼠进行了无偏差的数量性状基因(QTL)定位研究, 确定了可能影响体细胞 Htt

CAG 重复扩增的单一修饰位点^[39], 进一步巩固了 MMR 基因作为 *Htt* CAG 重复增强因子的关键作用。作者利用同系交配的遗传图谱分析和目的基因敲除的方法, 在 *Hdh^{Q111}* 小鼠中证明了编码 MMR 修复通路重要组分 MutL γ (MLH1-MLH3)复合物的基因 *Mlh1* 和 *Mlh3* 对于体细胞 CAG 的延伸非常关键, MLH1 的蛋白水平可能是体细胞 CAG 延伸效率的驱动因子, 同时还发现抑制体细胞延伸能够延缓小鼠的发病进程(图 2)。

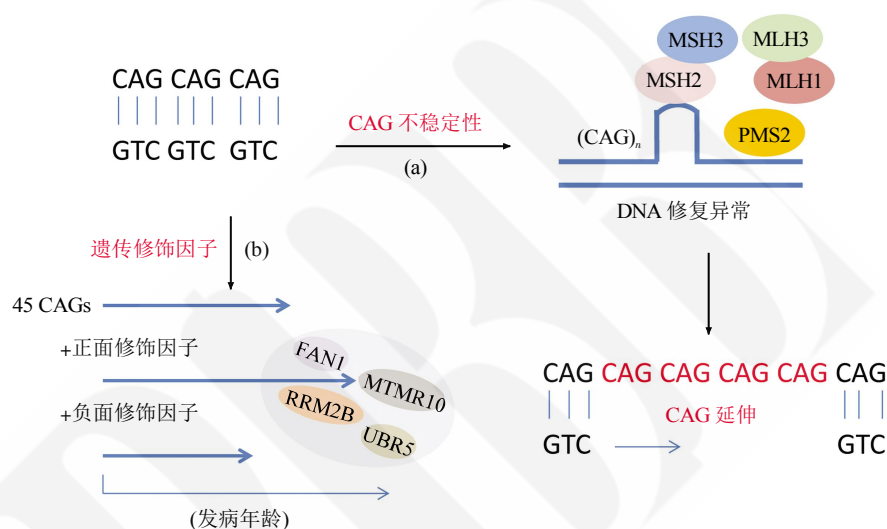


Fig. 2 DNA repair impacts the onset age of HD

图 2 DNA 修复通路影响 HD 发病年龄

(a) DNA 损伤修复蛋白影响 CAG 的不稳定性. 一系列 DNA 修复蛋白尤其是 MMR 蛋白能够促进 *Htt* 中 CAG 的延伸, CAG 的延伸是 HD 发生时间和严重程度的关键影响因素. (b) DNA 修复蛋白是影响 HD 发病年龄的重要遗传修饰因子, DNA 修复蛋白的突变会导致 HD 症状出现年龄的推迟或者提前。

对于遗传修饰因子的分析也取得了很大进展。2015 年《细胞》(*Cell*)杂志报道, HD 遗传修饰联盟(GeM-HD)利用全基因组关联分析(GWAS)研究了影响 HD 发病年龄(AAO)的遗传因素, 在对超过 4000 名 HD 病人分析后, 发现了数个可以加快或延迟 HD 发生的基因突变^[40]。作者发现 DNA 修复的突变极为显著, 在 15 号染色体上 *FAN1* 的突变和 8 号染色体上 *RRM2B* 的突变都能够影响 HD 的发病时间。FAN1 是一种核酸酶, 参与 DNA 链间交联(ICL)修复, 并在 DNA 合成过程中对于重启停滞的复制叉非常重要^[41-43]。RRM2B 作为脱氧核糖核酸三磷酸合成中限速酶的亚基, 参与 DNA 合成和修

复, 还能够调控线粒体 DNA 含量并抑制氧化应激通路的活化^[44-46]。通路分析同时也发现 3 号染色体上 *MLH1* 基因与 HD 发病年龄的关联。随后 Bettencourt 等组织了 1 462 个 HD 和脊髓小脑共济失调症(SCAs)患者, 对上述 GWSA 研究结果中选取变化最显著的单核苷酸多态性(SNP)进行基因型分析, 通过 DNA 修复基因进行组群分析, 发现 DNA 修复与发病年龄表现出显著的关联性, 证明了 DNA 修复通路基因的突变与 polyQ 疾病的发病年龄密切相关, 揭示了 polyQ 疾病可能的共性机制——疾病模型中体细胞的 polyQ 延伸能够被 DNA 修复的基因操作所改变(图 2)。

4 DNA 损伤关键修复蛋白 ATM 是潜在的 HD 治疗靶点

HD 与 DNA 损伤修复关键调控因子 ATM 联系日益紧密. ATM 是 DNA 双链断裂(DSBs)修复中关键的信号因子, 在 DNA 修复的早期阶段起着信号识别的作用, 在 DNA 损伤后发生自磷酸化, 到达损伤位点招募并激活下游一系列的多蛋白复合物来调控修复过程^[3]. ATM 另一个重要的核内功能就是诱导细胞凋亡, 当细胞中 DNA 损伤过多无法修复时, ATM 会直接磷酸化 p53 激活其促凋亡功能. 除了参与 DNA 损伤修复和细胞凋亡, ATM 还有很多胞质靶点并参与很多神经退行性疾病相关的信号通路^[48]. 在很多神经退行性疾病中 ATM 信号都是异常调节的, 阿尔茨海默病(AD)的小鼠模型显示淀粉样蛋白 APP 转基因会导致脑部 γ H2AX 异常的持续磷酸化^[49]. 在 HD 中, 转染 mHtt 的细胞表现出 ATM 激活的增多, HD 病人来源的成纤维细胞和 HD 模型小鼠及病人的纹状体神经元中 γ H2AX 的表达也明显升高^[21, 50].

ATM 除了能被 DNA 损伤反应所激活, 在维持细胞稳态和线粒体信号方面也起着非常关键的作用^[51], 线粒体氧化反应产生的活性氧(reactive oxygen species, ROS)以及低氧环境都能激活 ATM. 线粒体是细胞的能量生产车间, 也是电子传递链(ETC)产生 ROS 的来源. ATP 合成的过程中电子会传递给分子氧形成氧自由基, 导致过氧化物的形成和活性氧. 当线粒体功能存在障碍时 ROS 的产生会放大, 很多衰老和疾病的发生与之相关, 例如阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病、肌萎缩侧索硬化和 A-T(共济失调毛细血管扩张, *Atm* 突变导致), 一些 DNA 损伤缺陷疾病也存在线粒体异常和氧化压力的升高, 甚至有研究者认为这些疾病是线粒体疾病^[10, 52-53]. 线粒体异常也是亨廷顿病的重要发病机理之一, HD 细胞中线粒体的形态和结构都发生变化, 同时某些电子传递链复合物蛋白的活性或表达水平有所下降, 钙信号发生紊乱^[54].

研究显示 ATM 缺失小鼠的线粒体存在问题, 线粒体中超氧化物歧化酶 MnSOD 的表达升高, 线粒体的呼吸水平异常^[55-56]. A-T 淋巴瘤细胞中的线粒体表现出结构异常, 膜电位的下降以及线粒体氧化损伤标志蛋白例如 MnSOD 的表达升高^[57]. A-T

成纤维细胞中 DNA 合成相关酶水平很低, 同时发现线粒体 DNA 拷贝数的减少, 还表现出 DNA 连接酶 III 的减少, 导致线粒体修复缺陷和线粒体功能异常^[58-59]. 在 ATM 缺失的小鼠肌肉中细胞色素 C 氧化酶的活性也是显著降低的^[60]. 这些结果说明 ATM 在线粒体功能、增殖和活性中起着关键作用. ATM 缺失的胸腺细胞由于存在线粒体自噬障碍, 导致线粒体的数量有所增加, 同时 ROS 的产生增多^[61]. 在解偶联剂 CCCP 的处理下, ATM 会定位到线粒体并被激活, 另外细胞中 DJ-1(帕金森病蛋白 7)的蛋白质水平很低. 在 A-T 细胞中 Parkin 出现在线粒体上, 而在正常细胞 Parkin 通常弥散分布在胞质. PINK1、Parkin 和 DJ-1 这 3 个蛋白都与家族性的帕金森病有关, 共同参与神经元保护. Qi 等^[62]的研究发现, 人成纤维细胞中亚精胺诱导的线粒体自噬是 ATM 依赖的, PINK1/Parkin 信号通路的激活需要 ATM, PINK1 可能是 ATM 的一个底物. 另外, ATM 的底物 p53 能够调控线粒体代谢, 同时决定细胞的生命和死亡. ATM 的缺失会导致线粒体融合、线粒体膜的超极化、线粒体数量的增加和 ROS 的过度产生, PINK1 剪切增加, 导致了受损线粒体清除的障碍, 抑制 ATM 会阻碍自噬, 诱导细胞凋亡的发生. ATM 在调节细胞稳态以及线粒体信号中的作用也能为亨廷顿病的发病机理以及将 ATM 作为治疗靶点做出一些提示.

将 ATM 作为治疗靶标在细胞及动物模型中都表现出积极作用, 降低 ATM 基因含量或者利用药物抑制 ATM 活性能够改善 HD 表型. 降低 ATM 下游靶标 p53 的基因含量对 HD 细胞、果蝇和小鼠模型都是有利的^[63], 早在 2003 年利用 ATM/ATR 抑制剂——咖啡因处理细胞就能降低 mHtt 诱导的 DNA 损伤应答反应^[30]. mHtt 与 ATM 相互作用阻碍了 ATM 在 DNA 损伤后的核穿梭, 在细胞试验中利用他汀和二磷酸盐的联合用药能够加速 ATM 的入核, 增大了 DSBs 的识别效率和修复比例^[27]. 在人神经母细胞瘤细胞中表达突变 Htt 片段会引发细胞毒性诱导细胞凋亡, 利用 shRNA 敲低 ATM 能够使细胞免于死亡. 同时在 HD 果蝇模型中 ATM 同源基因 *tefu* 的失活能够使果蝇的运动缺陷有所恢复. *Atm* 单等位基因失活的 HD 转基因小鼠在运动和行为测试中表现得比 *Atm*^{+/+} 的 HD 小鼠更好, 这也说明降低 ATM 的基因含量可以部分缓解 HD 的症状. ATM 抑制剂 KU-60019 处理能够保护纹状

体神经元和 HD 病人来源的诱导性多能干细胞 (iPCS) 分化的神经细胞免受 mHtt 诱导的细胞毒性损害^[31]。上述研究对于将 DNA 修复通路作为神经退行性疾病的治疗靶点有着重要意义, 也有助于开发用于人类的临床治疗手段和有效药物。

5 结论与展望

随着神经退行性疾病发病率的逐渐升高, 科学家迫切希望找到一些共同的致病机制, 大量的研究指向一个共同的结论——DNA 修复异常可能是各类神经退行性疾病的共同机制。在很多神经退行性疾病包括 HD 中都存在着异常的 DNA 修复, 异常的 DNA 修复导致 DNA 损伤的进行性积累, 引发 DNA 和表观遗传的广泛改变, 最终导致神经元正常功能的缺失以及细胞死亡。

DNA 损伤修复在 HD 的发病中起关键作用, 因此阐明 Htt 参与 DNA 损伤修复的具体分子机制非常重要, 这也为 HD 的治疗和药物开发提供了新的思路 and 方向。大量证据显示, 抑制 ATM 信号能够保护神经元, 这意味着针对 DNA 修复的治疗方法可能被用于神经退行性疾病的治疗, 同时还需要进一步的研究来评估靶向 DNA 损伤修复通路治疗 HD 的效果、药物优化以及药物安全性。另外一个需要关注的方向就是确定改变疾病病程的相关影响因素, 确定调控基因位点, 增大研究样本, 监测更多的修饰基因, 揭示改变 HD 发病的通路, 为 HD 以及其他神经退行性疾病的治疗提供更多精确的靶点以及药物开发的新方向。

参 考 文 献

- [1] MacDonald M E, Ambrose C M, Duyao M P, *et al.* A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, 1993, **72**(6): 971-983
- [2] Ross C A, Truant R. DNA repair: A unifying mechanism in neurodegeneration. *Nature*, 2017, **541**(7635): 34-35
- [3] Ciccio A, Elledge S J. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*, 2010, **40**(2): 179-204
- [4] Madabhushi R, Pan L, Tsai L H. DNA damage and its links to neurodegeneration. *Neuron*, 2014, **83**(2): 266-282
- [5] Roos R A. Huntington's disease: a clinical review. *Orphanet J Rare Dis*, 2010, **5**: 40
- [6] Trottier Y, Lutz Y, Stevanin G, *et al.* Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias. *Nature*, 1995, **378**(6555): 403-406
- [7] Harjes P, Wanker E E. The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. *Trends Biochem Sci*, 2003, **28**(8): 425-433
- [8] Cattaneo E, Zuccato C, Tartari M. Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci*, 2005, **6**(12): 919-930
- [9] Maynard S, Fang E F, Scheibye-Knudsen M, *et al.* DNA damage, DNA repair, aging, and neurodegeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2015, **5**(10)
- [10] Bhat A H, Dar K B, Anees S, *et al.* Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomed Pharmacother*, 2015, **74**: 101-110
- [11] Rass U, Ahel I, West S C. Defective DNA repair and neurodegenerative disease. *Cell*, 2007, **130**(6): 991-1004
- [12] Morris E J, Geller H M. Induction of neuronal apoptosis by camptothecin, an inhibitor of DNA topoisomerase-I: evidence for cell cycle-independent toxicity. *J Cell Biol*, 1996, **134**(3): 757-770
- [13] Sarkander H I, Dulce H J. Studies on the regulation of RNA synthesis in neuronal and glial nuclei isolated from rat brain. *Exp Brain Res*, 1978, **31**(3): 317-327
- [14] Ljungman M, Lane D P. Transcription - guarding the genome by sensing DNA damage. *Nat Rev Cancer*, 2004, **4**(9): 727-737
- [15] Stack E C, Dedeoglu A, Smith K M, *et al.* Neuroprotective effects of synaptic modulation in Huntington's disease R6/2 mice. *J Neurosci*, 2007, **27**(47): 12908-12915
- [16] Browne S E, Bowling A C, MacGarvey U, *et al.* Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann Neurol*, 1997, **41** (5): 646-653
- [17] Polidori M C, Mecocci P, Browne S E, *et al.* Oxidative damage to mitochondrial DNA in Huntington's disease parietal cortex. *Neurosci Lett*, 1999, **272**(1): 53-56
- [18] Kim J, Moody J P, Edgerly C K, *et al.* Mitochondrial loss, dysfunction and altered dynamics in Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, 2010, **19**(20): 3919-3935
- [19] Kovtun I V, Liu Y, Bjoras M, *et al.* OGG1 initiates age-dependent CAG trinucleotide expansion in somatic cells. *Nature*, 2007, **447**(7143): 447-452
- [20] Jonson I, Ougland R, Larsen E. DNA repair mechanisms in Huntington's disease. *Mol Neurobiol*, 2013, **47**(3): 1093-1102
- [21] Illuzzi J, Yerkes S, Parekh-Olmedo H, *et al.* DNA breakage and induction of DNA damage response proteins precede the appearance of visible mutant huntingtin aggregates. *J Neurosci Res*, 2009, **87**(3): 733-747
- [22] Arlett C F. Presymptomatic diagnosis of Huntington's disease? *Lancet*, 1980, **1**(8167): 540
- [23] Moshell A N, Tarone R E, Barrett S F, *et al.* Radiosensitivity in Huntington's disease: implications for pathogenesis and presymptomatic diagnosis. *Lancet*, 1980, **1**(8158): 9-11
- [24] McGovern D, Webb T. Sensitivity to ionising radiation of

- lymphocytes from Huntington's chorea patients compared to controls. *J Med Genet*, 1982, **19**(3): 168–174
- [25] Arlett C F, Priestley A. Deficient recovery from potentially lethal damage in some gamma-irradiated human fibroblast cell strains. *Br J Cancer Suppl*, 1984, **6**: 227–232
- [26] Deschavanne P J, Fertil B. A review of human cell radiosensitivity in vitro. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1996, **34**(1): 251–266
- [27] Ferlazzo M L, Sonzogni L, Granzotto A, *et al.* Mutations of the Huntington's disease protein impact on the ATM-dependent signaling and repair pathways of the radiation-induced DNA double-strand breaks: corrective effect of statins and bisphosphonates. *Mol Neurobiol*, 2014, **49**(3): 1200–1211
- [28] Cornforth M N, Bedford J S. A quantitative comparison of potentially lethal damage repair and the rejoining of interphase chromosome breaks in low passage normal human fibroblasts. *Radiat Res*, 1987, **111**(3): 385–405
- [29] Jeggo P A, Lobrich M. DNA double-strand breaks: their cellular and clinical impact? *Oncogene*, 2007, **26**(56): 7717–7719
- [30] Giuliano P, De Cristofaro T, Affaitati A, *et al.* DNA damage induced by polyglutamine-expanded proteins. *Hum Mol Genet*, 2003, **12**(18): 2301–2309
- [31] Lu X H, Mattis V B, Wang N, *et al.* Targeting ATM ameliorates mutant Huntingtin toxicity in cell and animal models of Huntington's disease. *Sci Transl Med*, 2014, **6**(268): 268ra178
- [32] Enokido Y, Tamura T, Ito H, *et al.* Mutant huntingtin impairs Ku70-mediated DNA repair. *J Cell Biol*, 2010, **189**(3): 425–443
- [33] Qi M L, Tagawa K, Enokido Y, *et al.* Proteome analysis of soluble nuclear proteins reveals that HMGB1/2 suppress genotoxic stress in polyglutamine diseases. *Nat Cell Biol*, 2007, **9**(4): 402–414
- [34] Maiuri T, Mocle A J, Hung C L, *et al.* Huntingtin is a scaffolding protein in the ATM oxidative DNA damage response complex. *Hum Mol Genet*, 2017, **26**(2): 395–406
- [35] Kennedy L, Evans E, Chen C M, *et al.* Dramatic tissue-specific mutation length increases are an early molecular event in Huntington disease pathogenesis. *Hum Mol Genet*, 2003, **12**(24): 3359–3367
- [36] Kovalenko M, Dragileva E, St Claire J, *et al.* Msh2 acts in medium-spiny striatal neurons as an enhancer of CAG instability and mutant huntingtin phenotypes in Huntington's disease knock-in mice. *PLoS One*, 2012, **7**(9): e44273
- [37] Manley K, Shirley T L, Flaherty L, *et al.* Msh2 deficiency prevents *in vivo* somatic instability of the CAG repeat in Huntington disease transgenic mice. *Nat Genet*, 1999, **23**(4): 471–473
- [38] Tome S, Holt I, Edelmann W, *et al.* MSH2 ATPase domain mutation affects CTG*CAG repeat instability in transgenic mice. *PLoS Genet*, 2009, **5**(5): e1000482
- [39] Pinto R M, Dragileva E, Kirby A, *et al.* Mismatch repair genes Mlh1 and Mlh3 modify CAG instability in Huntington's disease mice: genome-wide and candidate approaches. *PLoS Genet*, 2013, **9**(10): e1003930
- [40] Genetic Modifiers of Huntington's Disease C. Identification of Genetic Factors that Modify Clinical Onset of Huntington's Disease. *Cell*, 2015, **162**(3): 516–526
- [41] Kratz K, Schopf B, Kaden S, *et al.* Deficiency of FANCD2-associated nuclease KIAA1018/FAN1 sensitizes cells to interstrand crosslinking agents. *Cell*, 2010, **142**(1): 77–88
- [42] MacKay C, Declais A C, Lundin C, *et al.* Identification of KIAA1018/FAN1, a DNA repair nuclease recruited to DNA damage by monoubiquitinated FANCD2. *Cell*, 2010, **142**(1): 65–76
- [43] Chaudhury I, Stroik D R, Sobek A. FANCD2-controlled chromatin access of the Fanconi-associated nuclease FAN1 is crucial for the recovery of stalled replication forks. *Mol Cell Biol*, 2014, **34**(21): 3939–3954
- [44] Pontarin G, Ferraro P, Bee L, *et al.* Mammalian ribonucleotide reductase subunit p53R2 is required for mitochondrial DNA replication and DNA repair in quiescent cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(33): 13302–13307
- [45] Bourdon A, Minai L, Serre V, *et al.* Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet*, 2007, **39**(6): 776–780
- [46] Kuo M L, Sy A J, Xue L, *et al.* RRM2B suppresses activation of the oxidative stress pathway and is up-regulated by p53 during senescence. *Sci Rep*, 2012, **2**: 822
- [47] Bettencourt C, Hensman-Moss D, Flower M, *et al.* DNA repair pathways underlie a common genetic mechanism modulating onset in polyglutamine diseases. *Ann Neurol*, 2016, **79**(6): 983–990
- [48] Shiloh Y, Ziv Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, **14**(4): 197–210
- [49] Suberbielle E, Sanchez P E, Kravitz A V, *et al.* Physiologic brain activity causes DNA double-strand breaks in neurons, with exacerbation by amyloid-beta. *Nat Neurosci*, 2013, **16**(5): 613–621
- [50] Bertoni A, Giuliano P, Galgani M, *et al.* Early and late events induced by polyQ-expanded proteins: identification of a common pathogenic property of polyQ-expanded proteins. *J Biol Chem*, 2011, **286**(6): 4727–4741
- [51] Choy K R, Watters D J. Neurodegeneration in ataxia-telangiectasia: Multiple roles of ATM kinase in cellular homeostasis. *Dev Dyn*, 2017[Epub ahead of print](DOI: 10.1002/dvdy.24522)
- [52] Chen H, Chan D C. Mitochondrial dynamics—fusion, fission, movement, and mitophagy—in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet*, 2009, **18**(R2): R169–176
- [53] Maciejczyk M, Mikoluc B, Pietrucha B, *et al.* Oxidative stress, mitochondrial abnormalities and antioxidant defense in Ataxia-telangiectasia, Bloom syndrome and Nijmegen breakage syndrome. *Redox Biol*, 2017, **11**: 375–383
- [54] Wang J Q, Chen Q, Wang X, *et al.* Dysregulation of mitochondrial calcium signaling and superoxide flashes cause mitochondrial

- genomic DNA damage in Huntington disease. *J Biol Chem*, 2013, **288**(5): 3070–3084
- [55] Kamsler A, Daily D, Hochman A, *et al.* Increased oxidative stress in ataxia telangiectasia evidenced by alterations in redox state of brains from Atm-deficient mice. *Cancer Res*, 2001, **61**(5): 1849–1854
- [56] Stern N, Hochman A, Zemach N, *et al.* Accumulation of DNA damage and reduced levels of nicotine adenine dinucleotide in the brains of Atm-deficient mice. *J Biol Chem*, 2002, **277**(1): 602–608
- [57] Ambrose M, Goldstine J V, Gatti R A. Intrinsic mitochondrial dysfunction in ATM-deficient lymphoblastoid cells. *Hum Mol Genet*, 2007, **16**(18): 2154–2164
- [58] Eaton J S, Lin Z P, Sartorelli A C, *et al.* Ataxia-telangiectasia mutated kinase regulates ribonucleotide reductase and mitochondrial homeostasis. *J Clin Invest*, 2007, **117**(9): 2723–2734
- [59] Sharma N K, Lebedeva M, Thomas T, *et al.* Intrinsic mitochondrial DNA repair defects in Ataxia Telangiectasia. *DNA Repair (Amst)*, 2014, **13**: 22–31
- [60] Patel A Y, McDonald T M, Spears L D, *et al.* Ataxia telangiectasia mutated influences cytochrome c oxidase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, **405**(4): 599–603
- [61] Valentin-Vega Y A, Maclean K H, Tait-Mulder J, *et al.* Mitochondrial dysfunction in ataxia-telangiectasia. *Blood*, 2012, **119**(6): 1490–1500
- [62] Qi Y, Qiu Q, Gu X, *et al.* ATM mediates spermidine-induced mitophagy via PINK1 and Parkin regulation in human fibroblasts. *Sci Rep*, 2016, **6**: 24700
- [63] Bae B I, Xu H, Igarashi S, *et al.* p53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease. *Neuron*, 2005, **47**(1): 29–41

DNA Damage Response and The Pathogenesis of Huntington's Disease*

ZHU Shu^{1)**}, TANG Tie-Shan²⁾

⁽¹⁾ Joint Postdoctoral Programme of College of Economic and Social Development in Nankai University
and Chinese Academy of Science and Technology for Development, Beijing 100038, China;

²⁾ State Key Laboratory of Membrane Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant hereditary neurodegenerative disorder, caused by mutation of *Htt* gene which encoding huntingtin (Htt). Expanded Htt proteins form aggregates accumulated in cells and result in progressive neuronal degeneration and dysfunction. There are many hypothesis on the pathogenesis of HD, such as oxidative stress and mitochondrial dysfunction. Report on *Nature* in 2017 highlights that DNA repair as a shared mechanism in neurodegenerative disorders. More and more evidences indicate that DNA repair mechanisms have been implicated in Huntington's Disease, mutant Htt triggers different types of DNA lesions and excessive activation of DNA damage response. HD is associated with cellular radiosensitivity and double strand break repair defect, and mutant Htt impact the normal function of ATM(ataxia tetangtectasia mutated) in DNA repair. Moreover, DNA repair proteins also impact the onset age of HD. Targeting ATM can ameliorates mutant Huntingtin toxicity in cells and animal models of HD. ATM has a important role in regulating cellular homeostasis and mitochondria signaling, so the mechanism of targeting ATM is more and more clear. This review introduces recent advances in HD and DNA damage response, opens a new direction for study of pathogenic mechanism and development of therapies.

Key words Huntington's disease, huntingtin, DNA damage response, ATM, age at onset

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0208

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China(30970931).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-58884621, E-mail: zhus@casted.org.cn

Received: June 5, 2017 Accepted: August 17, 2017